

総説

Damps 分子と敗血症の病態生理

森 秀治^{1,2)}, 豊村隆男¹⁾¹⁾ 就実大学薬学部, ²⁾ 就実大学大学院医療薬学研究科

Damage-associated molecular patterns as a new target for sepsis

Shuji Mori^{1,2)}, Takao Toyomura¹⁾¹⁾ School of Pharmacy, Shujitsu University²⁾ Graduate School of Clinical Pharmacy, Shujitsu University

(Received 9 December 2013; accepted 23 December 2013)

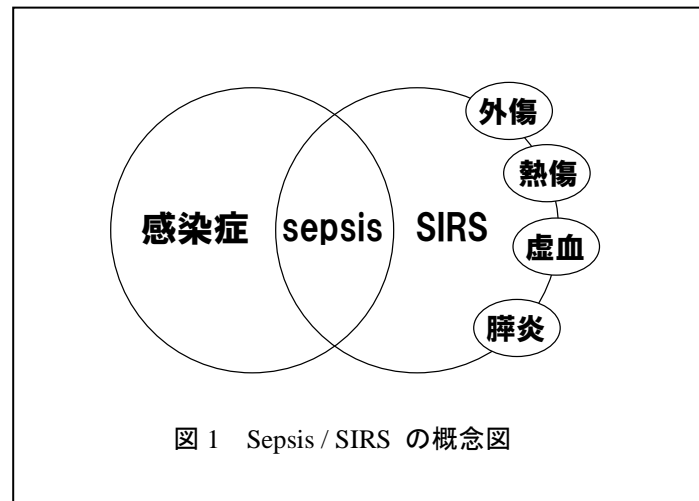
Abstract: Sepsis is systemic inflammatory response syndrome (SIRS) induced by bacterial infection. From prospective epidemiologic study of SIRS and related conditions, septic shock has been reported to give the mortality rate of 46%. In progression of sepsis, damp (damage-associated molecular patterns) molecules are suggested to play crucial pathophysiological roles. Particularly, high mobility group box 1 (HMGB1) is highly conserved, ubiquitous protein present in the nuclei and cytoplasm of nearly all cell types. In response to infection or injury, HMGB1 is released passively from injured or damaged cells or actively secreted from innate immune cells, then acts as a potent proinflammatory cytokine and is involved in delayed endotoxin lethality and sepsis. The target therapy against HMGB1 by specific antibody provides remarkable protective effects in inflammatory disease models of endotoxemia and sepsis. In this paper, we described the efficacy of HMGB1 as a target for sepsis, and discussed its therapeutic potentials.

Keywords: sepsis, damage-associated molecular patterns.

緒言

感染を主たる原因とする全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) の一つに分類され, 生体侵襲をともなった非特異的な全身性自然免疫炎症応答のことを, 一般に「敗血症 (sepsis)」と称する¹⁾ (図1). 現在, 全身性炎症反応症候群 (SIRS) の病態は, 次の3段階 (ステージ I ~ III) で進行するとされている²⁾. ステージ I : 侵襲に対して, 局所でサイトカインが産生され, 炎症反応を惹起し, 創

治癒と網状内皮系の活性化を促す. ステージ II : 局所で産生されたサイトカインは, 循環内へと放出され, これによって growth factor が刺激され, マクロファージと血小板が産生される. この急性期反応は, 炎症を惹起する因子と内因性の拮抗因子によってコントロールされ, 恒常性が維持されている. ステージ III : 炎症反応のコントロールが破綻し, 炎症が局所に留まらず全身へ波及した場合, サイトカインは生体の保護因子ではなく, む



しる破壊因子として働き、多数のカスケードと網状内皮系が活性化され、循環動態が破綻するため、臓器不全が生じる。すなわち、SIRSとは本来は生体にとって有益であるはずの炎症反応が過剰になり様々な表現型で生体破壊をもたらした病態像と捉えることができ、その中で敗血症は感染によって生じたSIRSと位置付けられる。

敗血症の中でも、臓器障害を付随したものを severe sepsis、ショックを付随したものを septic shock と言い、それぞれの死亡率は、疫学研究から SIRS 7%、sepsis 16%、severe sepsis 20%と増加し、septic shock においては 46%と非常に高い死亡率を示すことが明らかになっており、その根治的治療法の開発は現代医療において極めて社会的要請度の高い喫緊の課題である³⁾。

敗血症の重症度や病態進行を客観的に把握して早期に正確な診断と治療計画を策定することは、患者に対する適正な治療を実施する上で極めて重要なプロセスであるが、現時点で敗血症病態を正確に反映し得るバイオマーカーは存在しないのが現状である。これまでに、敗血症に関連すると考えられた 178 種類のマーカー候補について検討が行われたものの、何れも敗血症の病態を客観的に反映することはできず、日常診療に汎用されている C 反応性タンパク質 (CRP) やプロカルシトニン等も他の炎症性疾患との区別や病態予後を推察するための指標としては不十分であると指摘されている⁴⁾。例えば、古典的な感染症

の指標として古くから白血球数と CRP が知られているが、両者ともに病態への反映が遅く手術や外傷によっても上昇が認められることから、疾患の経過中に感染症を合併しても正確な病態認識をすることは不可能である。また、細菌培養検査も結果が得られるまでに数日を要し、septic shock でも陽性率は 1/3～2/3 と極めて幅があり^{5,6)}、正確な病態把握をするには不十分と考えられている。同様に、発熱、頻脈、頻呼吸などの身体所見が敗血症時に生じるが特異的ではなく、他の様々な疾患（深部静脈血栓や肺塞栓など）でも体温上昇が認められ⁷⁾、たとえ体温が 38.4 度以上の発熱をきたしたとしても感染症との関連は 53%に留まる⁸⁾。加えて、1979～2000 年にかけて米国で実施された敗血症を対象にした大規模な疫学調査から、22 年間で敗血症の発症率は人口 10 万人あたり 82.7 例から 240.4 例へと大幅な増大が認められること、臓器障害の合併率も 1.58 倍に増えていることも判明し⁹⁾、現代の集約的治療をもってしても敗血症の病態重症化に対する歯止めが極めて不十分であることが明らかになっている。敗血症の予後は治療開始の時期に大きく影響し、治療が遅くなれば、その分だけ死亡率が上昇してしまう。しかしながら、現時点における敗血症の診断基準は必ずしも特異的であるとは言えず、感染症に随伴する種々の非特異的身体所見 (CRP, プロカルシトニン, 白血球数など) を組み合わせて病態把握をしていくしかないのが現状である。

このような状況の中で、近年、敗血症時の多臓器不全の病態形成に、Damps (Damage-associated molecular patterns) と称される一連の分子群が、増悪化因子として重要な役割を担っていることが明らかになってきた^{10, 11)}。Damps は、Toll 様受容体や RAGE (Receptor for advanced glycation end products) を代表とするパターン認識受容体 (Pattern recognition receptors) を刺激することで炎症応答を惹起し、敗血症病態の重症化に寄与する。Damps は単一の分子では無く、図2に示すようにこれまでに複数の物質が Damps 分子として機能することが明らかとなっている。従来の考えでは、原則として単一の分子が特異的リガンドとして単一の受容体を刺激し、このことが細胞内シグナルを活性化し、免疫担当細胞の活性化 (炎症性サイトカイン産生増大、活性酸素産生増大、細胞接着因子発現亢進、細胞遊走亢進など) をもたらした、敗血症病態を形成していくものと考えられてきたが、パターン認識受容体の存在に立脚した

現在の概念では、パターン認識受容体は、Damps 分子に存在する共通の立体構造を感知して活性化する、いわゆるマルチリガンド受容体と考えられている。すなわち、リガンドと受容体の対応が、従来の1対1ではなく、複数対複数の関係にあるという考え方である。現在では、Damps 分子の他に、リポ多糖 (LPS) や細菌特異的 DNA, CpG DNA などの Pamps (Pathogen-associated molecular patterns) 分子群もパターン認識受容体を刺激することが明らかにされており、敗血症の発症要因と病態解析をより複雑なものにしている。

Damps 分子群の中でも、HMGB1 (high mobility group box 1) は代表的 Damps と位置付けられる。HMGB1 は、生体侵襲や刺激に応じて細胞内から細胞外へ放出され、細胞外でパターン認識受容体の一つである RAGEなどを刺激するサイトカイン様因子として振る舞い、NF- κ B 活性化を介して炎症増悪化や臓器障害に働く。現に、敗血症の臨床研究において、敗血症の生存症例と死亡症

パターン認識受容体	代表例	Damps	Pamps
Toll様受容体	TLR1	HSP60	bacterial lipopeptide
	TLR2		lipoprotein
	TLR3		dsRNA
	TLR4	HSPs, HMGB1	LPS, uric acid
	TLR5		flagellin
	TRL6		diacyllipoprotein
	TLR8		ssRNA
	TLR9		CpG DNA
	TLR10		unknown
	TLR11		profilin like protein
RAGE受容体	RAGE	HMGB1, S100	LPS
NOD様受容体	IPAF	SAP130	flagellin
	Nalp1b		anthrax
	Nalp3		bacterial RNA, uric acid
	Nod1, 2		peptideglycan
RIG-1様受容体	MDA5		picornavirus
	RIG-1		paramyxovirus
C型レクチン受容体	Dectin1		β -glucan
	Dectin2		α -mannan
	Langerin		HIV, M.leprae
	Mincle		micobacteria

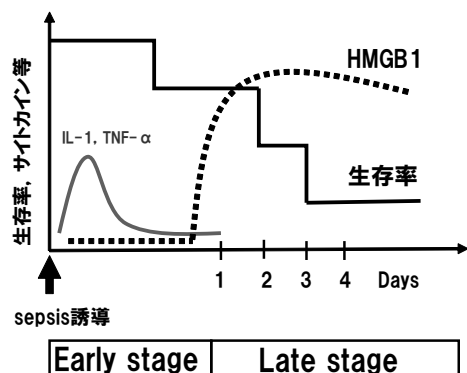
図2 Damps 分子, Pamps 分子とパターン認識受容体

例を比較した場合に血液中の HMGB1 濃度は死亡症例で有意に高値かつ持続することが報告されている⁷⁾. HMGB1 は、すべての有核細胞の核内で発現する 215 アミノ酸残基から成る分子量 30kDa の非ヒストンタンパク質であり、核内タンパク質画分を電気泳動にかけた際に早期に移動することによって由来して HMGB1 と名付けられている. その一次構造は、進化の過程で高度に保存されており、哺乳類では約 98% の高い相同性を示す. HMGB1 欠損マウスでは、いくつかの身体的特徴（体が小さい、脂肪少ない、体毛が薄いなど）が示され、出生後 24 時間以内で早期に低血糖で死亡してしまうことより（糖分補給を行っても数日以内で死亡する）、HMGB1 が個体の生存にとって極めて重要な因子であることも示唆されている¹²⁾. 1999 年に Tracey らの研究グループは、HMGB1 が敗血症後期に出現してくる致死メディエータであることを初めて報告した¹³⁾. 従来から、敗血症モデル動物（LPS 投与マウス）において炎症性サイトカイン（IL-1 や TNF- α ）の血中濃度が最大となる時期よりも遅れて個体死のピークが出現し、両者の時期が全く一致していないこと、TNF- α 欠損動物でも LPS 投与によって死亡が観察されることなどの知見から、従来の炎症性サイトカイン（IL-1 や TNF- α ）以外の未知因子が敗血症の増悪化に働いているのではないかと考えられていた. Tracey らは、マウスマ

クロファージ細胞株を LPS 刺激し、培養上清中に遅発的に出現する HMGB1 が敗血症増悪化の鍵因子であることを見出した. 彼らの報告の中で、LPS 刺激後、IL-1 と TNF- α は 2~6 時間を最大値として出現するのに対し、HMGB1 は個体死が生じる時期と一致する 16~32 時間後にピークに達すること、更に HMGB1 に対する抗体の投与によって、敗血症モデル動物の生存率が著明に改善することも明らかにされた（図 3）.

この発見をきっかけにして、HMGB1 の多彩な免疫・炎症賦活化作用、病態生理学的意義、受容体研究、シグナリング研究などが世界中で精力的に進められ、今日では HMGB1 が組織・細胞の傷害時に細胞外へと放出・分泌され、マクロファージなどの免疫担当細胞を活性化することで生体防御や組織修復（時には増悪化因子）として働く Damp 分子の一員であることが確立されるに至っている. 核内から細胞外へと放出・分泌された HMGB1 は、RAGE や Toll 様受容体などのパターン認識受容体を刺激し、このシグナルは MAP キナーゼ群（ERK1/2, p38, JNK）の活性化や活性酸素産生増大を介して、NF- κ B の活性化をもたらす、種々の炎症応答（炎症性サイトカイン産生増大など）を惹起することになる（図 4）.

敗血症における知見に加えて、HMGB1 は様々な重篤疾患の発症・増悪化過程に重要な役割を果たすことが明らかとなっている. HMGB1 を標



敗血症モデルにおいて、個体死の発生時期に一致して HMGB1 の出現ピークが認められ、HMGB1 が致死メディエータとして再発見された。
Science 285: 248-251 (1999) より

図 3 HMGB1 の敗血症における致死メディエータとしての再発見

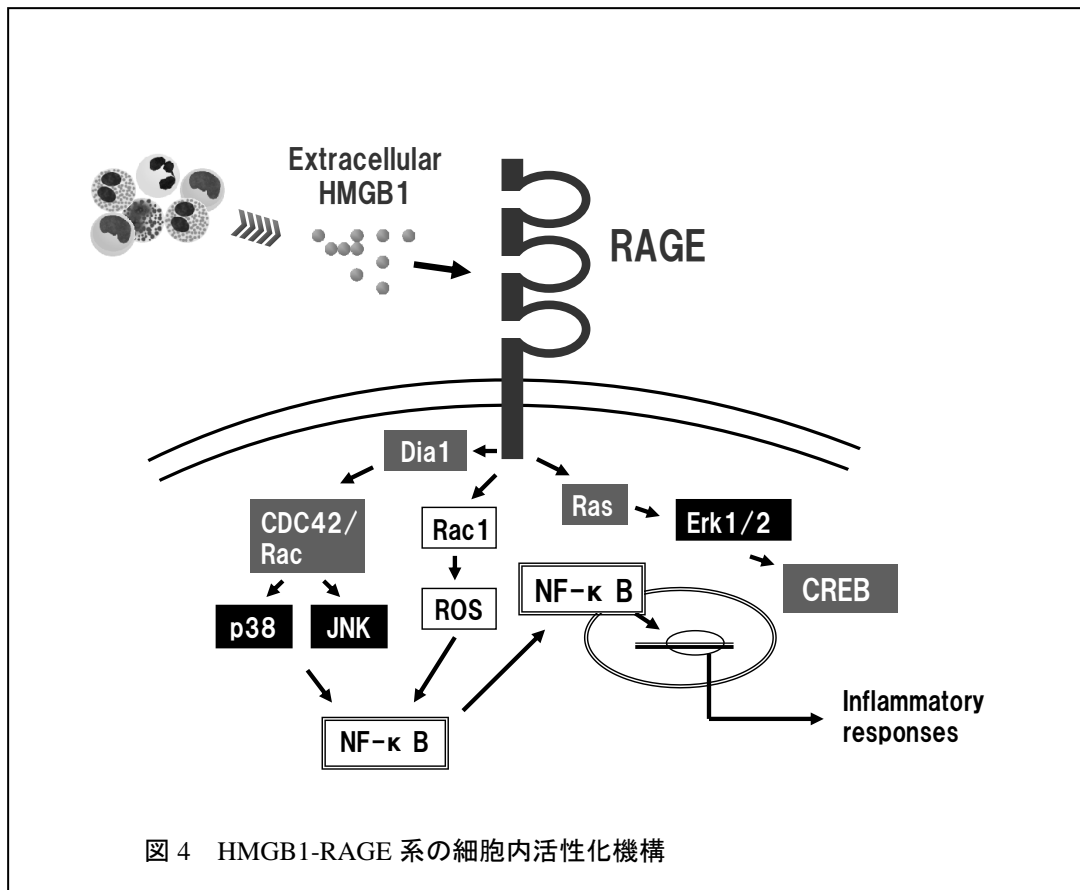


図4 HMGB1-RAGE系の細胞内活性化機構

的分子に定めて、その病態生理学的意義の解明とともに抗 HMGB1 抗体による治療効果を検討した我々の研究においても、様々な難治性疾患モデル、例えば脳外傷、脳梗塞、動脈硬化などで、抗 HMGB1 抗体の投与が劇的な治療効果をもたらすことが明らかにされている^{14, 15, 16, 17)}。その他に自己免疫疾患(全身性エリテマトーデスや関節リウマチなど)、虚血性心疾患、急性肺障害、出血性ショックなどの様々な疾患の基盤分子として HMGB1 の意義が報告されている^{18, 19)}。HMGB1 を標的とした治療の方策として、特異的抗 HMGB1 抗体を用いる方法のほかに HMGB1 の N 末端側ドメイン (A ボックスと呼ばれる) の投与が敗血症に対して治療効果を有することも報告されている¹³⁾。また、HMGB1 放出阻害薬を目指した研究から、LPS で刺激された免疫細胞からの HMGB1 遊離を阻害し得る物質としてピルビン酸エチルやニコチンなどが既に見出されており、今後の臨床に向けた応用展開が大いに期

待されるところである^{20, 21)}。

本稿では、Damps 分子、特に HMGB1 を中心に敗血症における治療標的としての意義に焦点を当てて述べてきた。しかしながら、現時点で敗血症ショック発症時の死亡率は 46%と極めて高く、一刻も早い治療法の確立が望まれるところである。敗血症の致死のメディエータとしての HMGB1 ならびにパターン認識受容体の発見を契機にして、これらの分子群による生体内情報伝達機構と病態生理学的な意義付けが急速に明らかとなっている。様々な基礎研究から HMGB1 を初めとする Damps 分子群が敗血症の有用な創薬標的分子であることは紛れもない事実であり、今後は、アカデミア機関のみならず創薬に関わる国内外の力を結集することによって、これまでに開発された特異抗体や Damps 放出阻害物質などの臨床応用を見据えた橋渡しの研究の活発な推進が望まれる。

引用文献

- 1) Bone RC., Balk RA., Cerra FB., Dellinger RP., Fein AM., Knaus WA., Schein RM., Sibbald WJ.: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine., *Chest*, 101 (6) 1644-1655 (1992).
- 2) Bone RC., Fisher CJ Jr., Clemmer TP., Slotman GJ., Metz CA., Balk RA.: Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group., *Crit Care Med*, 17 (5) 389-393 (1989).
- 3) Rangel-Frausto MS., Pittet D., Costigan M., Hwang T., Davis CS., Wenzel RP.: The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study., *JAMA*, 273 (2) 117-123 (1995).
- 4) Pierrakos C., Vincent JL.: Sepsis biomarkers: a review., *Crit Care*, 14 (1) R15 (2010).
- 5) Annane D., Aegerter P., Jars-Guincestre MC., Guidet B.: Current epidemiology of septic shock: the CUB-Réa Network, *Am J Respir Crit Care Med*, 168 (2) 165-172 (2003).
- 6) Brun-Buisson C., Doyon F., Carlet J.: Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. French Bacteremia-Sepsis Study Group., *Am J Respir Crit Care Med*, 154 (3 Pt 1) 617-624 (1996).
- 7) Hotchkiss RS., Karl IE.: The pathophysiology and treatment of sepsis., *N Engl J Med*, 348 (2) 138-150 (2003).
- 8) Circumaru B., Baldock G., Cohen J.: A prospective study of fever in the intensive care unit., *Intensive Care Med*, 25 (7) 668-673 (1999).
- 9) Martin GS., Mannino DM., Eaton S., Moss M.: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000., *N Engl J Med*, 348 (16) 1546-1554 (2003).
- 10) Bianchi ME.: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger., *J Leukoc Biol*, 81 (1) 1-5 (2007).
- 11) Tang D., Kang R., Coyne CB., Zeh HJ., Lotze MT.: PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity., *Immunol Rev* 249 (1) 158-175 (2012).
- 12) Calogero S., Grassi F., Aguzzi A., Voigtländer T., Ferrier P., Ferrari S., Bianchi ME.: The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice., *Nat Genet*, 22 (3) 276-280 (1999).
- 13) Wang H., Bloom O., Zhang M., Vishnubhakat JM., Ombrellino M., Che J., Frazier A., Yang H., Ivanova S., Borovikova L., Manogue KR., Faist E., Abraham E., Andersson J., Andersson U., Molina PE., Abumrad NN., Sama A., Tracey KJ.: HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice., *Science*, 285 (5425) 248-251 (1999).
- 14) Okuma Y., Liu K., Wake H., Zhang J., Maruo T., Date I., Yoshino T., Ohtsuka A., Otani N., Tomura S., Shima K., Yamamoto Y., Yamamoto H., Takahashi HK., Mori S., Nishibori M.: Anti-high mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury., *Ann Neurol*, 72 (3) 373-384 (2012).
- 15) Kanellakis P., Agrotis A., Kyaw TS., Koulis C., Ahrens I., Mori S., Takahashi HK., Liu K., Peter K., Nishibori M., Bobik A.: High-mobility group box protein 1 neutralization reduces development of diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31 (2) 313-319 (2011).
- 16) Zhang J., Takahashi HK., Liu K., Wake H., Liu R., Maruo T., Date I., Yoshino T., Ohtsuka A., Mori S., Nishibori M.: Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats., *Stroke*, 42 (5) 1420-1428 (2011).
- 17) Liu K., Mori S., Takahashi HK., Tomono Y., Wake H., Kanke T., Sato Y., Hiraga N., Adachi N., Yoshino T., Nishibori M.: Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats., *FASEB J*, 21 (14) 3904-3916 (2007).
- 18) Harris HE., Andersson U., Pisetsky DS.: HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease., *Nat Rev Rheumatol*, 8 (4) 195-202 (2012).
- 19) Andersson U., Tracey KJ.: HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection., *Annu Rev Immunol*, 29 139-162 (2011).
- 20) Ulloa L., Ochani M., Yang H., Tanovic M., Halperin D., Yang R., Czura CJ., Fink MP., Tracey KJ.: Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation., *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (19) 12351-12356 (2002).
- 21) Wang H., Liao H., Ochani M., Justiniani M., Lin X., Yang L., Al-Abed Y., Wang H., Metz C., Miller EJ., Tracey KJ., Ulloa L.: Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis., *Nat Med*, 10 (11) 1216-1221 (2004).